

УДК 577.352.3:612.111.3

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА

Н. Н. ТИМЧЕНКО^{1*}, В. А. РУБАКИНА², М. П. ЕВСТИГНЕЕВ², С. Н. ЛАВРИНЕНКО³

¹ Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко, Харьков

² Севастопольский государственный университет, Севастополь

³ Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков

*email: timchenko_n@list.ru

АННОТАЦИЯ Досліджено вплив температури в області +4-+38°C на спектроскопічні властивості гемоглобіну в розчинах гемолізату при різних термінах зберігання гемолізату. Визначено вміст різних форм гемоглобіну (окси-, дезокси- і метгемоглобіну) в розчині гемолізату при різних температурах в залежності від термінів зберігання. Встановлено, що при збільшенні терміну зберігання від 1 до 7 діб в розчині гемолізату зменшується вміст оксигемоглобіну і збільшується вміст дезокси- і метгемоглобіну.

Ключові слова: гемолізат, температура, оксигемоглобін, дезоксигемоглобін, метгемоглобін

АННОТАЦИЯ Исследовано влияние температуры в области +4-+38°C на спектроскопические свойства гемоглобина в растворах гемолизата при различных сроках хранения гемолизата. Определено содержание различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина) в растворе гемолизата при различных температурах в зависимости от сроков хранения. Установлено, что при увеличении срока хранения от 1 до 7 дней в растворе гемолизата уменьшается содержание оксигемоглобина и увеличивается содержание дезокси- и метгемоглобина.

Ключевые слова: гемолизат, температура, оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, метгемоглобин

INFLUENCE OF THE TEMPERATURE ON THE CONTENTS OF DIFFERENT FORMS OF HEMOGLOBIN

N. N. TIMCHENKO¹, V. A. RUBAKINA², M. P. EVSTIGNEEV², S. N. LAVRINENKO³

¹ Kharkiv Petro Vasilenko national technical university of agriculture, Kharkov

² Sevastopol State University, Sevastopol

³ National Technical University "Kharkov Polytechnic Institute", Kharkov

ABSTRACT The purpose of investigation is studying of temperature influence in the range of +4-+38°C on the hemoglobin spectroscopic properties in hemolysate solutions of different storage terms at +4°C and determining of different forms of hemoglobin contents (oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin and methemoglobin). Hemolysate solutions from 1 to 7 days of storage at +4°C were investigated. Different forms of hemoglobin contents (oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin and methemoglobin) was determined by special formulas using values of absorbance spectra intensity of hemoglobin at definite wave lengths. There is a quantity of oxyhemoglobin in the hemolysate solution which decreased on the whole as compared to hemolysate of 1 day of storage at increasing of hemolysate solutions storage terms from 1 to 7 days. Thus in control at +4°C the contents of oxyhemoglobin in hemolysate solution of 7 days of storage was less as compared to the contents of oxyhemoglobin in hemolysate solution at +4°C of 1 day of storage. Also the contents of deoxyhemoglobin and methemoglobin in hemolysate solution at 4°C of 7 days of storage was increased. It is possible to associate with the fact that erythrocyte membranes are separated from cells and do not carrying out their save function in hemolysate solutions. It is possible that increase of hemolysate storage terms decrease ability of hemoglobin to binding of oxygen at temperature higher than +20°C. Also these facts can be connected with peculiarity of erythrocytes of donors from which hemolysate solutions were obtained.

Keywords: hemolysate, temperature, oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, methemoglobin

Введение

Изучение влияния различных факторов на процесс связывания кислорода гемоглобином является очень важным с точки зрения понимания того, как эритроциты осуществляют газотранспортную функцию. В настоящее время в мировой литературе представлены данные исследований кровезаменителей на основе

гемоглобина. Одним из факторов, влияющих на содержание различных форм гемоглобина, является температура. Содержание различных форм гемоглобина может быть определено спектрофотометрическим методом. Спектрофотометрический метод измерения поглощения света состоит в регистрации спектра поглощения веществ. Оптический спектр представляет собой зависимость параметра,

описывающего распределение интенсивности или вероятности поглощения или излучения от длины волны или волнового числа. В данной работе анализировали спектры поглощения гемоглобина в области 450-700 нм.

Цель работы

Целью работы является исследование влияния температуры в области $+4$ – $+38^{\circ}\text{C}$ на спектроскопические свойства гемоглобина в растворах гемолизата различных сроков хранения и определение содержания различных форм гемоглобина (оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и метгемоглобина) в растворе гемолизата. Исследовали растворы гемолизата от 1 до 7 дней хранения при $+4^{\circ}\text{C}$.

Изложение основного материала

Эритроциты осаждали путем трёхкратного центрифугирования в течение 10 минут при 1500 g донорской крови и физиологического раствора в объемном соотношении 1:10. Гемолизат получали путем добавления одного объема дистиллированной воды и хранения 24 часа при $+4^{\circ}\text{C}$.

Для определения содержания различных форм гемоглобина в растворе гемолизата записывали спектры поглощения гемоглобина на спектрофотометре, измеряли интенсивность поглощения гемоглобина на определенных длинах волн, использовали формулы, описанные в [1].

Содержание различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина) связано с газотранспортной функцией эритроцитов. О газотранспортной, или дыхательной функции эритроцитов судят по емкости, насыщению и сродству. Транспортируемые в нормальных условиях дыхания газы – это кислород экзогенного происхождения, оксид углерода (IV) и оксид углерода (II) – эндогенного. Термином емкость определяют способность крови, эритроцитов и гемоглобина связывать максимальное количество этих газов, поэтому емкость зависит от содержания эритроцитов и гемоглобина в крови. Реальное использование этой возможности связано с рядом условий и определяется термином насыщение. Емкость реализуется через сродство эритроцитов и гемоглобина к молекулам газов, оно зависит от структуры (типа) гемоглобина и физико-химических особенностей среды внутри эритроцита.

Газотранспортная функция эритроцитов, подобно любой другой функции организма, развивается постепенно, претерпевая сложные возрастные изменения, масштабы которых зависят от видовых, экологических особенностей организма. В процессе формирования представления о развитии

газотранспортной функции в онтогенезе накоплены материалы о возрастной динамике таких показателей, как содержание эритроцитов и гемоглобина в крови, объем крови, размеры клеток, т.е. всего того, что определяют как физиологические характеристики. Изучаются вопросы, связанные с влиянием эритроцитов на сродство гемоглобина к кислороду, степени насыщения эритроцитов кислородом в разном возрасте и рядом других функциональных показателей, ролью органических фосфатов, содержащихся в эритроцитах, как специфических модификаторов свойств гемоглобина.

В раннем онтогенезе динамика состава популяции эритроцитов сложнее, чем в зрелом возрасте, потому что собственное созревание эритроидных клеток модифицируется в зависимости от созревания всего организма. Основой этой модификации служит меняющаяся с возрастом локализация эритропоэза. В результате меняется суммарный состав клеток, создавая картину динамического поведения ткани. Вклад различных групп эритроцитов в оксигенацию и газотранспортную функцию не одинаков. Изменение морфологии клеток крови сопровождается перестройкой физико-химических свойств и устойчивости к гемолитикам. Клетки крови плода проявляют повышенную устойчивость к гемолитикам. У всех позвоночных изменение локализации эритропоэза и переход от мегалобластического к нормобластическому типу приводят к тому, что состав циркулирующей крови растущего плода все более отличается от клеточного состава кроветворной ткани. Газотранспортную функцию выполняют клетки, все более зрелые и однородные по величине и физико-химическим свойствам. Дефинитивный характер клеток проявляется тем в большей степени, чем более зрелым к моменту рождения должен быть организм. Эритроциты одной популяции отличаются друг от друга соотношением разных типов гемоглобина, вследствие этого разные эритроциты обладают неодинаковыми возможностями для выполнения газотранспортной функции. На эти различия влияют величина сродства различных гемоглобинов к кислороду и отношение их к действию внутриэритроцитарных факторов — pH, органических фосфатов.

Основной функцией гемоглобина, входящего в состав эритроцитов, является транспорт кислорода из легких животного во внутренние органы и обратный – углекислого газа [2]. Гемоглобин состоит из двух пар миоглобин-подобных субъединиц. Четыре субъединицы вместе образуют почти правильный тетраэдр. Молекула кислорода присоединяется к гемам, используя шестую координационную связь Fe^{2+} так же как и в случае миоглобина. В связывании углекислого газа участвуют свободные α -аминогруппы N-концов гемоглобина [3].

Внутри тетрамера существует полость, пронизывающая всю молекулу на 5 нм по ее высоте.

Полость выглядит как две коробки, поставленные друг на друга и повернутые перпендикулярно друг другу. Высота каждой около 2,5 нм, длина – 2,0, ширина – 0,8-1,0. Ширина коробок соответствует расстоянию между идентичными субъединицами. Полость формируется главным образом неполярными остатками [4].

Методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения идентифицировано расположение молекул воды, наиболее прочно связанных с деокси- и метформой гемоглобина [5]. Некоторое количество молекул воды локализовано в области контактов между субъединицами и образует мостиковые связи, дополнительно стабилизируя тетрамер.

Много молекул воды на поверхности субъединиц зарегистрировано вблизи полярных групп субъединиц гемоглобина [6]. На картах электронной плотности гемоглобина всего зарегистрировано только 90 молекул воды. Это составляет 10% от гидратной оболочки гемоглобина. Остальная часть обладает большей подвижностью и не может быть зарегистрирована рентгеноструктурным методом. Процесс присоединения кислорода тетрамером гемоглобина носит кооперативный характер. Кооперативность в данном случае означает, что присоединение первых молекул кислорода к гемоглобину облегчает присоединение остальных молекул кислорода. Гемоглобин можно рассматривать как белок, моделирующий аллостерические свойства ферментов. В результате подведения итогов серии рентгеноструктурных исследований предложен стереохимический механизм гем-гемового взаимодействия [7]. При переходе гемоглобина из окси- в деоксиформу наиболее значительно изменяется четвертичная структура белка. Пусковым механизмом этих изменений является перемещение атома железа на 0,075 нм относительно плоскости порфиринового кольца одной из субъединиц при связывании в шестом положении Fe (II) молекулы O₂. Fe (II) при этом переходит из высоко- в низкоспиновое состояние и располагается в плоскости гема. Атом железа как бы “подтягивает” к гему проксимальный остаток гистидина. Это вызывает перемещение спирали к центру молекулы и вытеснение ТирС2(140) из полости между спиралями. Дальнейшие события приводят к поэтапному разрыву солевых мостиков, стабилизирующих четвертичную структуру деоксиформы гемоглобина, и переходу гемоглобина в оксиформу. Переход гемоглобина из деокси- в оксиформу сопровождается разрывом шести солевых мостиков и освобождением протонов (эффект Бора). Этот процесс характеризуется уменьшением энергии взаимодействия между субъединицами на 25-50 кДж/моль.

Поскольку содержание различных форм гемоглобина связано с газотранспортной функцией эритроцитов, важно исследовать влияние на этот показатель температуры, как фактора, действующего

на состояние организма. В настоящем исследовании при рассмотрении влияния температуры на содержание различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина) в растворах гемолизата при различных сроках хранения было определено, что содержание оксигемоглобина уменьшается при увеличении температуры от +4°C до +38°C и происходит увеличение содержания дезокси- и метгемоглобина. Значительное уменьшение содержания оксигемоглобина происходит после повышения температуры от +20°C до +38°C. При повышении температуры от +4°C до +20°C содержание оксигемоглобина понижается на 6%, а после дальнейшего увеличения температуры до +38°C уменьшается на 18%. При увеличении сроков хранения гемолизата от 1 до 7 дней количество оксигемоглобина в растворе гемолизата 7 дней хранения уменьшилось в целом по сравнению с количеством оксигемоглобина в растворе гемолизата 1 дня хранения.

Обсуждение результатов

Температура является фактором, который может оказывать влияние на состояние гемоглобина [8]. В работе [9] было исследовано влияние температуры на состояние внутриэритроцитарного гемоглобина, т.е. гемоглобина, находящегося в клетке – в эритроците. В настоящей работе предметом исследования было состояние гемоглобина в растворах гемолизатов различных сроков хранения при действии температур в диапазоне +4-+38°C. Гемолизат представляет собой массу гемолизированных (разрушенных) эритроцитов, которые, находясь не в физиологическом растворе, а в дистиллированной воде, лопнули, мембраны эритроцитов («тени») разрушились, отделились от клетки, гемоглобин вышел во внешнюю среду. Таким образом в гемолизате присутствуют и гемоглобин, и мембраны эритроцитов, но они уже существуют не в составе клетки, а вышли из неё. В работе [9] отмечается, что в зависимости от донора и сроков хранения эритромаксы влияние температуры на содержание различных форм внутриэритроцитарного гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина) имеет особенности. Происходит уменьшение содержания оксигемоглобина и увеличение содержания дезокси- и метгемоглобина. Содержание форм гемоглобина отклоняется от усреднённого хода температурной зависимости, что происходит в одном или нескольких температурных интервалах около +8-+12, +18-+24, +28-+30°C. В настоящем исследовании определено, что температура влияет на состояние гемоглобина в гемолизате таким образом, что содержание оксигемоглобина уменьшается значительно в области +20-+38°C, при этом увеличивается содержание дезокси- и метгемоглобина. Из графических данных,

представленных в работе [9], и описывающих влияние температуры на внутриэритроцитарный гемоглобин, видно, что при повышении температуры от +20°C до +38°C содержание оксигемоглобина внутри эритроцита уменьшается на 7-8%. В нашем исследовании показано, что при действии температуры на гемоглобин в гемолизате, начиная с +20°C и выше, содержание оксигемоглобина уменьшается на 18% (рис. 1) и на 22% (рис. 2). Существующий термотропный переход в области +20°C, по-видимому, связан с тем, что при этих температурах наблюдаются изменения характеристик глюкозного транспорта в эритроцитах [10], но это замечание справедливо для целостной клетки эритроцита, в нашем же исследовании эритроциты разрушены. Белковые перестройки наблюдаются в гипотермической области – была обнаружена способность белков в растворе претерпевать термоиндуцированные структурные изменения [11]. При сравнении количеств оксигемоглобина в растворах гемолизатов 3-х и 5-ти дней хранения, (рис. 1, 2), видно, что в начале температурной зависимости количество оксигемоглобина в растворе гемолизата 5-ти дней хранения меньше (82%) по сравнению с количеством оксигемоглобина в растворе гемолизата 3-х дней хранения (88%). При увеличении сроков хранения растворов гемолизата от 1 до 7 дней количество оксигемоглобина уменьшилось в целом по сравнению с раствором гемолизата 1 дня хранения. Т.е. в контроле при температуре +4°C содержание оксигемоглобина в растворе гемолизата 7 дней хранения было меньше по сравнению с содержанием оксигемоглобина в растворе гемолизата при +4°C 1 дня хранения. Возможно, это связано с тем, что в гемолизате мембраны эритроцитов отделены от клеток и не выполняют свою защитную функцию. Возможно, увеличение сроков хранения растворов гемолизата уменьшает способность гемоглобина связывать кислород при температуре выше +20°C. Это может быть связано с особенностями эритроцитов доноров, от которых получали растворы гемолизата.

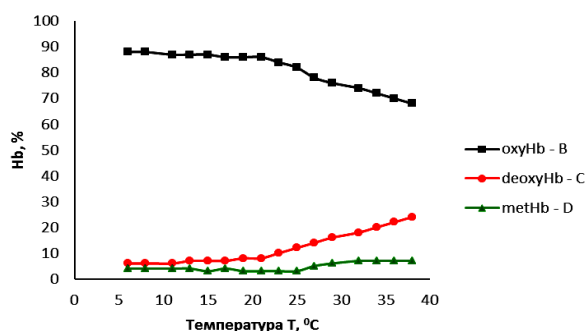


Рис. 1 – Содержание различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метформы) в гемолизате 3-х дней хранения при действии температуры

Выводы

При увеличении сроков хранения растворов гемолизата от 1 до 7 дней количество оксигемоглобина уменьшается в целом по сравнению с раствором гемолизата 1 дня хранения. Это может быть связано, в частности, с особенностями эритроцитов доноров, от которых получали растворы гемолизатов.

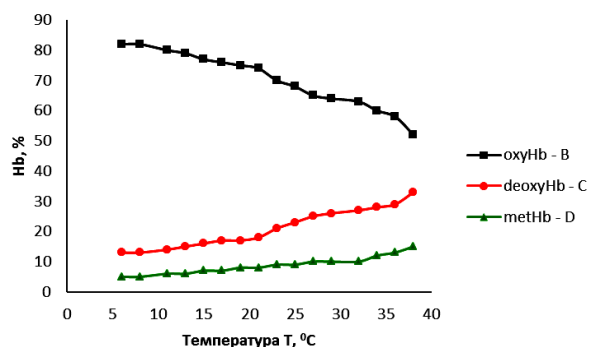


Рис. 2 – Содержание различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метформы) в гемолизате 5-ти дней хранения при действии температуры

Список литературы

- 1 Стусь, Л. Н. Осцилляция форм гемоглобина в процессе хранения крови / Л. Н. Стусь, Е. Д. Розанова // *Биофизика*. – 1992. – Т.37, № 2. – С. 387-388.
- 2 Denniston, Katherine J. General, organic and Biochemistry / Katherine J. Denniston, Joseph J. Topping, Robert L. Caret – Towson University. – 2007. – 801 p.
- 3 Rossi-Bernardi, L. The specific influence of carbon dioxide and carbonate compounds on buffer power and Bohr effects in human haemoglobin solutions / L. Rossi-Bernardi, F. J. W. Roughton // *J. Physiol.* – 1967. – Vol. 189. – P. 1-29.
- 4 Ehrenstein, G. Translational variations in the aminoacid sequence of the α -chain of rabbit hemoglobin / G. Ehrenstein // *Gold Spring Harbor Sympos. Quantit. Biol.* – 1966. – Vol. 31. – P. 705-714.
- 5 Fermi, G. Three-dimensional Fourier syntess of human deoxyhaemoglobin at 2,5 Å resolution: refinement of the atomic model / G. Fermi // *J. Mol. Biol.* – 1975. – Vol. 97. – P. 237-256.
- 6 Takano, T. Structure of myoglobin refined at 2,0 Å resolution / T. Takano // *J. Mol. Biol.* – 1977. – Vol. 110. – P. 533-584.
- 7 Perutz, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin / M. F. Perutz // *Nature*. – 1970. – Vol. 228. – P. 726-739.
- 8 Kruszyna, Harriet. Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulphhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin / Harriet

Kruszyna, Robert Kruszyna // *Biochemical pharmacology*. – 1993. – Vol. 46, № 1. – P. 95-102.

- 9 **Морозова, Т. Ф.** Влияние температуры на состояние внутриэритроцитарного гемоглобина / **Т. Ф. Морозова, Е. Д. Розанова, Н. Н. Тимченко** // *Вестник НТУ «ХПИ»*. – 2007. – № 30. – С. 69-73.
- 10 **Матус, В. К.** Влияние хлорпромазина и температуры на транспорт глюкозы в теньях эритроцитов человека / **В. К. Матус** // *Биофизика*. – 1977. – т. 22, вып. 5. – С. 861-865.
- 11 **Жуковский, А. А.** Об изменении теплоёмкости при денатурации белков / **А. А. Жуковский** // *Биофизика*. – 1983. – т. 34, вып. 33. – С. 518-519.

Bibliography (transliterated)

- 1 **Stus, L. N.** The oscillation of hemoglobin forms during blood storage / *Biophysics*. – 1992. – № 2. – S. 387- 388.
- 2 **Denniston, Katherine J.** General, organic and Biochemistry. – Towson University. – 2007. – 801 p.
- 3 **Rossi-Bernardi, L.** The specific influence of carbon dioxide and carbonate compounds on buffer power and Bohr effects in human haemoglobin solutions / *J. Physiol.* – 1967/ – № 189/ – P. 1-29.
- 4 **Ehrenstein, G.** Translational variations in the aminoacid

sequence of the α -chain of rabbit hemoglobin / *Gold Spring Harbor Sympos. Quantit. Biol.* – 1966. – № 31. – P. 705-714.

- 5 **Fermi, G.** Three-dimensional Fourier syntess of human deoxyhaemoglobin at 2,5 Å resolution: refinement of the atomic model / *J. Mol. Biol.* – 1975. – № 97. – P 237-256.
- 6 **Takano, T.** Structure of myoglobin refined at 2,0 Å resolution / *J. Mol. Biol.* – 1977. – № 110. – P. 533-584.
- 7 **Perutz, M. F.** Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin / *Nature*. – 1970. – № 228. – P. 726-739.
- 8 **Kruszyna, Harriet.** Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulphhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin / *Biochemical pharmacology*. – 1993. – № 46. – P. 95-102.
- 9 **Morozova, T. F.** Temperature influence on the state of hemoglobin inside erythrocyte / *Vestnik NTU «HPI»*. – 2007. – № 30. – P. 69 - 73.
- 10 **Matus, V. K.** Influence of chlorpromazine and temperature on the glucose transport in erythrocyte shadows / *Biophysics*. – 1977. – № 22. – P. 861-865.
- 11 **Zhukovskiy, A. A.** About heat capacity changing at protein denaturation / *Biophysics*. – 1983. – № 34 – P. 518- 519.

Поступила (received) 16.06.2015